総 説

全身性エリテマトーデスにおけるオステオポンチン

北 郡 宏 次, 吉 藤 元

Osteopontin in systemic lupus erythematosus

Koji KITAGORI and Hajime YOSHIFUJI

Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

(Accepted February 24, 2017)

summary

In systemic lupus erythematosus (SLE), lupus nephritis (LN) is an important complication as an intractable condition and considered to be a prognostic factor. Based on the past reports that explain immunological functions of OPN and its relationship with autoimmune diseases such as LN or IgA nephropathy, we measured OPN full and OPN N-half in serum and urine of SLE patients and examined the possibility as a disease biomarker. OPN N-half is known as a more physiologically active form than OPN full. As a result, OPN N-half in urine was higher in LN than in healthy control, and also higher than in diabetic nephropathy that is a non-inflammatory nephropathy. In addition, OPN N-half in urine decreased after the treatment of LN, suggesting that OPN N-half in urine could be a biomarker for evaluating disease activity of LN.

Key words——Systemic lupus erythematosus; Lupus nephritis; Osteopontin full; Osteopontin N-half

抄 録

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) の予後を規定する難治性病態の一つに、ループス腎炎 (lupus nephritis: LN) がある。これまでのオステオポンチン (osteopontin: OPN) の免疫に関連する機能および LN, IgA 腎症などの自己免疫疾患における発現亢進の報告に着目し, LN の血中, 尿中における全長 OPN (OPN full) および, 白血球に対する誘因活性を有する OPN N 末端断片 (OPN N-half) について解析し, LN における疾患バイオマーカーとしての可能性を検討した。結果, LN の尿中 OPN N-half 濃度は健常人に比べ高値を示し, さらに, 同様に蛋白尿を呈するが病態が異なる糖尿病性腎症よりも高値を示した。また, 尿中 OPN N-half は, LN の治療強化後に低下傾向を示したことから, 糸球体における炎症病態によって産生され, LN の疾患活動性と相関するバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

はじめに

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) は, 抗核抗体, 抗 dsDNA 抗体などの自己抗体産生と自己反応性 B, T 細胞の出現を特徴とする種々の免疫異常を伴う全身性自己免疫疾患である。様々な臓器病変を呈しうるが, 約半数例に合併するループス腎炎 (lupus nephritis: LN) はしばしば難治性であり, 進行すると腎不全に至るため, 治療や活動性マーカーの改良が必要とされている。一方, SLE の治療経過中に, 薬剤性やステロイド糖尿病などによる腎障害を伴うことがあるが, 従来の尿蛋白やクレアチニンなどのマーカーだけでは十分

な病態評価が困難であることも少なくない。腎障害の原因確定には腎生検が有用であるが, 侵襲リスクを伴うことから, 非侵襲的で疾患に特異的なバイオマーカーが望まれる。今回, 著者らは尿中オステオポンチンを, 特に全長型と N 末端断片を区別して測定し, LN の病態評価マーカーとしての有用性を検討した¹⁾ ため, 文献的考察を加え報告する。

オステオポンチンとは

オステオポンチン (OPN) は分泌性の糖蛋白質であり, 分子量は糖鎖修飾の違いにより幅がみられ, 44~66 kDa とされる²⁾。OPN は, 当初は骨基質を形成する分子として発見されたが, その後, 骨芽細胞だけでなく, 腎尿細管細胞やマクロファージ, 活性型 T 細胞などに発現していることが報告された³⁻⁶⁾。

その機能も、破骨細胞による骨吸収の促進、好中球・T細胞の炎症局所への集簇など、骨・免疫系に関わる多岐にわたる機能を有している^{7,8)}。全長 OPN (OPN full) は、マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (matrix metalloprotease-3: MMP-3) やトロンビンなどにより切断される⁸⁾ が、その N 末端断片 (OPN N-half) は免疫担当細胞の走触性を促進する活性を有しており、炎症・免疫に関連する分子として注目されている。走化性 (chemotaxis) が溶液中分子の濃度勾配により白血球等が誘引されることを意味するのに対し、走触性 (haptotaxis) は細胞等の表面に分布する分子の密度勾配により白血球等が誘引されることである。OPN の受容体はインテグリン分子群であり、OPN full, OPN N-half いずれも結合能を有するが、OPN N-half は OPN full と比較し $\alpha\beta 1$ -インテグリンへの結合能が高いなどの点で異なる性質を持つ⁹⁾。

オステオポンチンと免疫

Denhardt らは、OPN の遺伝子発現が、IL-1 β や IL-6, IFN- α , IFN- γ によって亢進することを示している¹⁰⁾。Tahir らは、老化関連 T 細胞 (senescence-associated T cell: SA-T) が、LN の動物モデルである NZBWF1 マウスで増加しており、SA-T の産生する OPN が、B 細胞のアポトーシスを抑制し、胚中心の形成と自己抗体の産生を促進すると報告した¹¹⁾。また、これまでに OPN 欠損マウスでは、破骨細胞やマクロファージ、Th1 細胞などの機能異常をきたすことが報告されている^{6,12)}。免疫疾患との関連では、ヒト SLE において、SLE 患者の血中・尿中 OPN full が健常人よりも高値であり、臓器障害や疾患活動性と相関すること¹³⁻¹⁵⁾、さらに、LN において遠位尿細管での OPN 発現レベルが血清クレアチニン (creatinine: Cre) 値や浸潤マクロファージ数と相関することが報告されている¹⁶⁾。

さらに、Gang らは、IgA 腎症において尿中 OPN full は健常人と比べ減少しているが、尿 OPN cleaved-type が増加しており尿蛋白と相関することを示し、尿中 OPN full が分解・代謝された結果、減少している可能性があると考えた¹⁷⁾。このように OPN full, OPN N-half いずれの分子も、免疫応答や自己免疫疾患、免疫を背景とした糸球体腎炎などへの関連が示唆されている。

オステオポンチンとループス腎炎

著者らは、OPN full と OPN N-half をそれぞれ特異的に検出する ELISA システムを用いて、SLE 患者 (ループス腎炎既往あり: LN, ループス腎炎既往なし: non-LN) における血中、尿中の OPN full, OPN N-half を測定し、健常人 (HC) や糖尿病性腎症 (DN), 微小変化群 (MCNS), IgA 腎症 (IgAN) などの、他の腎疾患群と比較検討した¹⁾。結果、尿中 OPN full に関しては、健常人と各疾患群とで有意な差は認められなかった (図 1 C, D) が、尿中 OPN N-half は、健常人と比較し LN で有意に増加していた ($p < 0.05$) (図 1 A)。さらに、LN 症例を尿蛋白量、すなわち尿蛋白クレアチニン比 (P/C ratio) 0.5 g/gCre 以上または未満で層別化し、活動性の有無で分けて比較したところ、尿蛋白量の多い (P/C > 0.5) LN において、尿蛋白量の少ない (P/C < 0.5) LN よりも尿中 OPN N-half は高値を示した ($p < 0.0001$)。追加検討として LN と DN を比較したところ、尿蛋白量の多い LN では、尿蛋白量が同程度に多い DN よりも尿中 OPN N-half が高値であった ($p < 0.01$) (図 1 B)。

血中 OPN full は、健常人と比較し、SLE (non-LN, LN), DN, MCNS において有意に高かったが、各疾患群の間では有意差を認めなかった (図 2)。血中 OPN N-half は、全てのサンプルにおいて測定感度以下であった。血中 OPN full の各疾患での上昇は、SLE (non-LN, LN) では炎症病態による上昇が考えられ、MCNS においても、T 細胞や IL-2 が病態に関連しているという報告^{18,19)} もあることから、炎症病態が関連している可能性が考えられた。DN では、肥満や Cre: 2.0 mg/dl 以上の例では血清 OPN の増加がみられるという報告²⁰⁾ もあり、クリアランスの低下が影響した可能性が考えられた。一方、血中の OPN N-half が測定感度以下であったことについては、早期に分解されるなどの理由が考えられた。

さらに、OPN full の切断酵素であるトロンビンと MMP-3 の SLE 患者尿中における活性を測定したところ、尿中トロンビン活性と尿中 OPN N-half の間に相関が認められた (図 3)。すなわち、炎症により糸球体で活性化されたトロンビンが尿中 OPN full を切断し、尿中 OPN N-half が産生されと考えられた。一方、非炎症病態が想定される糖尿病性腎症では、トロンビンの活性化が起らないため尿中 OPN N-half が低値を示したと考えられた (図 4)。

図1 尿中 OPN full, OPN N-half の各疾患, 健康人における比較

OPN full, OPN N-half はそれぞれ尿中 Cre で補正。A) 健康人, 各疾患患者における尿中 OPN N-half 値。B) LN, DN 患者の尿蛋白量別 (P/C 比 < 0.5, P/C 比 > 0.5), 尿中 OPN N-half 値。C) 健康人, 各疾患患者における尿中 OPN full 値。D) LN, DN 例の尿蛋白量別, 尿中 OPN full 値。A), C) by Dunn's test: * $p < 0.05$, B), D) by ANOVA corrected by the Bonferroni method: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. 文献 1) より引用。

図2 血中 OPN full の各疾患, 健康人における比較

by Dunn's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 文献 1) より引用。

図3 OPN full の切断酵素活性と尿中 OPN N-half の相関

SLE (N = 56) における尿中トロンビン活性と尿中 OPN N-half の相関関係。OPN N-half は尿中 Cre で補正。 r^2 : 決定係数。文献 1) より引用。

オステオポンチンのバイオマーカーとしての可能性

LN の炎症病態により尿中 OPN N-half が産生されることが示され, 尿中 OPN N-half が LN のバイオマーカーとして活用できる可能性が示唆されたため,

以下のように検討した。

まず, OPN N-half により, LN におけるネフロン内の障害部位を推定できるかを検討するために, 尿中アルブミン (ALB), β_2 -ミクログロブリン (β_2 M), cystatin C, calbindin, GST- π , KIM-1, NGAL,

図4 ループス腎炎における尿中 OPN N-half 産生機序
文献 1) Supply より引用。

clusterin, TEF3 などの、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管、集合管の傷害マーカーに、IL-18, MCP-1 などの炎症マーカーを加えて測定し、OPN N-half との相関を調べた。結果、尿中 OPN N-half と尿中 ALB ($R = 0.67$, $p < 0.0001$) および IL-18 ($R = 0.64$, $p < 0.0001$) との間に相関を認めた(表 1) が、特定の障害部位を示唆する分子との有意な相関は認めなかった。

次に、血中 OPN full, 尿中 OPN full, OPN N-half と SLE の活動性マーカーである抗 DNA 抗体や

SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index) との相関を解析したが、いずれも有意な相関関係は認めなかった(図 5)。抗 DNA 抗体や SLEDAI が、ループス腎炎の活動性のみではなく、腎炎も含めた SLE 全体の活動性を評価する指標であることが結果の乖離に影響していると考えられた。

一方、活動性 LN 患者 3 名の治療強化前後における尿中 OPN N-half の変化を測定した結果、2 名において治療強化後に OPN N-half が低下し、さらに尿蛋白の改善よりも早期にみられる傾向であった(図 6)。すなわち、尿中 OPN N-half が LN の臨床経過を反映するマーカーとして治療効果判定に利用できる可能性が示唆された。

最後に、尿中 OPN full および尿中 OPN N-half の測定により LN の ISN/RPS 病理分類^{21, 22)} を予測できないかを検討したところ、LN class IV では、尿中 OPN full が高い傾向にあり、LN class II では尿中 OPN N-half が低い傾向にあった(図 7)。これらのマーカーが、LN の病理型による病態の違いを反映し、病理型の予測に利用できる可能性が示唆されたが、さらなる症例の集積を要すると考えられた。

オステオポンチンをターゲットとした治療

OPN full および OPN N-half が、インテグリンを介した免疫細胞の集簇に関わる機能を有しているという過去の報告^{7, 8)} から、LN においても、これらの

表 1 尿中 OPN N-half と各腎障害マーカーとの相関

	Urine OPN full	Plasma OPN full	Total Protein	Albumin	IL-18	MCP-1	B ₂ M	Cystatin C	Calbindin	GST- π	KIM-1	NGAL	Clusterin	TFF3
R	0.08	0.19	0.44	0.67	0.64	0.39	0.25	0.27	0.27	0.42	0.34	0.33	0.38	0.19
p-value	0.56	0.17	0.0006	<0.0001	<0.0001	0.003	0.06	0.04	0.04	0.001	0.01	0.013	0.004	0.15

R: PEARSON の相関係数。R > 0.45 を有意な相関関係ありとした。B₂M, β_2 -microglobulin; GST- π , glutathione S-transferase pi; KIM-1, kidney injury molecule-1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; TFF3, trefoil factor 3。文献 1) より引用。

図5 血中、尿中 OPN と SLEDAI との相関

SLE (N = 56) における血中 OPN full, 尿中 OPN full, 尿中 OPN N-half と SLEDAI との相関関係。r²: 決定係数。文献 1) より引用。

図6 ループス腎炎患者の治療強化前後における尿蛋白、尿OPNの経時変化
代表例1例のみを表示。Day0に大量ステロイド治療(1 mg/kg/day)を開始。文献1)より引用。

分子が炎症細胞浸潤に関与している可能性が考えられる。OPN N-halfをターゲットとした抗体製剤などによるLNへの治療応用に結びつく可能性が期待される。

さいごに

LNの血中、尿中のOPN fullおよびOPN N-halfの動態を解析したところ、尿中OPN N-halfがLNの糸球体病変における炎症病態を反映すると推論され、尿中OPN N-halfをLNの活動性評価および治療効果判定に利用できる可能性が示唆された。日常診療における尿蛋白陽性例について、その原因が炎症性か非炎症性であるかを判別するツールとしても利用できる可能性がある。また、尿中物質の測定は非侵襲的であることから、将来、OPNを含む尿中バイオマーカーを組み合わせることによりLNの病理分類を予測できるようになることが期待される。さらに、OPNの炎症細胞集簇に関する作用から、LNの治療標的としての発展も期待される。

謝 辞

研究を行うにあたり、京都大学医学部附属病院免疫・膠原病内科、京都大学医学部附属病院腎臓内科、京都大学次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点の先生方には、多大なご協力を賜りました。この場をお借りして感謝申し上げます。

図7 尿中OPN full、OPN N-halfのループス腎炎class分類別評価
いずれの群も有意差は認めず。by Dunn's test。文献1)より引用。

文 献

- 1) Kitagori, K., et al.: Cleaved Form of Osteopontin in Urine as a Clinical Marker of Lupus Nephritis. *PLoS One*. **19**: e0167141, 2016.
- 2) Denhardt, D.T., et al.: Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*. **7**: 1475–1482, 1993.
- 3) Rittling, S.R., et al.: Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res*. **13**: 1101–1111, 1998.
- 4) Ihara, H., et al.: Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem*. **276**: 13065–13071, 2001.
- 5) Patarca, R., et al.: Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med*. **170**: 145–161, 1989.
- 6) Ashkar, S., et al.: Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*. **287**: 860–864, 2000.
- 7) Yamamoto, S., et al.: Effect of recombinant osteopontin on adhesion and migration of P388D1 cells. *Ann N Y Acad Sci*. **760**: 378–380, 1995.
- 8) O'Regan, A.W., et al.: Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol*. **162**: 1024–1031, 1999.
- 9) Yokosaki, Y., et al.: The Integrin $\alpha 9\beta 1$ Binds to a Novel Recognition Sequence (SVVYGLR) in the Thrombin-cleaved Amino-terminal Fragment of Osteopontin. *J Biol Chem*. **17**: 36328–36334, 1999.
- 10) Denhardt, D.T., et al.: Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*. **30–31**: 92–102, 1998.
- 11) Tahir, S., et al.: A CD153+CD4+ T follicular cell population with cell-senescence features plays a crucial role in lupus pathogenesis via osteopontin production. *J Immunol*. **194**: 5725–5735, 2015.
- 12) Yoshitake, H., et al.: Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. **6**: 8156–8160, 1999.
- 13) Wong, C.K., et al.: Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. **44**: 602–606, 2005.
- 14) Qiong, L., et al.: Detection of osteopontin in sera, urine and renal tissue in patients with systemic lupus erythematosus and its significance. *Chin J Dermatol*. **43**: 6–9, 2010.
- 15) Rullo, O.J., et al.: Plasma levels of osteopontin identify patients at risk for organ damage in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. **15**: R18, 2013.
- 16) Okada, H., et al.: Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis. *Am J Kidney Dis*. **36**: 498–506, 2000.
- 17) Gang, X., et al.: Reduced urinary excretion of intact osteopontin in patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis*. **37**: 374–379, 2001.
- 18) Daniel, V., et al.: T-lymphocyte populations, cytokines and other growth factors in serum and urine of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Nephrol*. **47**: 289–297, 1997.
- 19) Sahali, D., et al.: A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal-change nephrotic syndrome using subtracted cDNA library screening. *J Am Soc Nephrol*. **13**: 1238–1247, 2002.
- 20) Yamaguchi, H., et al.: Progression of diabetic nephropathy enhances the plasma osteopontin level in type 2 diabetic patients. *Endocr J*. **51**: 499–504, 2004.
- 21) Weening, J.J., et al.: The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int*. **65**: 521–530, 2004.
- 22) Weening, J.J., et al.: The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol*. **15**: 241–250, 2004.